

2026
?ss pn=jp 63230086
S5 1 PN=JP 63230086
?t s5/7/all

5/7/1
DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI
(c)1999 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007678032
WPI Acc No: 88-311964/198844
Carrier immobilising physiological active substance - comprises binding chain-form disulphide cpd. via epoxy gp. with latex contg. polymer particles
Patent Assignee: NITTO ELECTRIC IND CO (NITL)
Number of Countries: 001 Number of Patents: 001
Patent Family:
Patent No Kind Date Applicat No Kind Date Main IPC Week
JP 63230086 A 19880926 JP 8763630 A 19870317 198844 B

Priority Applications (No Type Date): JP 8763630 A 19870317

Patent Details:
Patent Kind Lan Pg Filing Notes Application Patent
JP 63230086 A 7

Abstract (Basic): JP 63230086 A

A carrier comprises binding chain-form disulphide cpd. having amino gp. or carboxyl gp. at the molecular terminal via an epoxy gp. with latex contg. polymer particles having epoxy gp. on the surface of 0.03-3 microm. in average particle size.

The polymer particles for the latex are obtd. by emulsion copolymerisation of a monomer mixt. of glycidyl (meth)acrylate, polyfunctional internal crosslinking monomer (e.g. poly(meth)acrylate of polyhydric alcohol such as ethylene glycol dimethacrylate) and (meth)acrylonitrile. The chain-form disulphide cpds. is e.g. cystamine, (homo)cystine, penicillamine disulphide, penicillamine cysteine disulphide, dithioglycolic acid, etc.. The reaction of the disulphide cpd. with the epoxy gp. of the polymer particles is carried out for some hrs.-some days at 20-90 deg.C, pref. 30-70 deg.C. The amt. of the disulphide bond on the surface of the carrier is 1×10^{-7} - 1×10^{-4} mol/square m, pref. 1×10^{-6} - 1×10^{-5} mol/square m.

USE/ADVANTAGE - The carrier is useful for immobilising physiological active substance having disulphide bond or thiol gp. in the molecule by disulphide bond exchange reaction. Physiological active substance (e.g. enzyme or protein) can be relatively easily immobilised on the carrier by covalent bond and resulting immobilised carrier has

good dispersion stability in an aq. medium. The amt. of physiological active substance immobilised can be increased as epoxy gp. can be introduced on the surface of latex polymer particles uniformly and with high density.

0/0

Derwent Class: A96; B04; D16; S03
International Patent Class (Additional): C07K-017/08; C12N-011/02;
G01N-033/54

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-230086

⑤Int.Cl.
C 12 N 11/02
C 07 K 17/08
G 01 N 33/545
33/547

識別記号
7329-4B
8318-4H
B-7906-2G
7906-2G

⑬公開 昭和63年(1988)9月26日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

④発明の名称 生理活性物質固定用担体

⑪特願 昭62-63630

⑫出願 昭62(1987)3月17日

⑬発明者 森 健二郎 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内
 ⑭発明者 木原 康夫 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内
 ⑮発明者 辻 孝 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内
 ⑯発明者 渡辺 哲男 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内
 ⑰出願人 日東電工株式会社 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号

明細書

1. 発明の名称

生理活性物質固定用担体

2. 特許請求の範囲

(1) 表面にエポキシ基を有する平均粒径 0.03~
3 μm の重合体粒子を含むラテックスに、分子末端にアミノ基またはカルボキシル基を有する鎖状ジスルフィド化合物が、上記エポキシ基と結合させていることを特徴とする生理活性物質固定用担体。

(2) 重合体粒子がグリシル(メタ)アクリレート、多官能性内部架構用单量体および(メタ)アクリロニトリルを含む单量体混合物を乳化共重合させて得られるものである特許請求の範囲第1項記載の生理活性物質固定用担体。

(3) 多官能性内部架構用单量体が多価アルコールのポリ(メタ)アクリレートである特許請求の範囲第2項記載の生理活性物質固定用担体。

3. 発明の詳細な説明

<生業上の利用分野>

本発明は生理活性物質固定用担体に関するもので、分子内にジスルフィド結合またはチオール基を有する生理活性物質をジスルフィド結合交換反応によって固定化できる生理活性物質固定用担体に関するものである。

<従来の技術>

酵素や抗体等の生理活性物質は、近年、その特異且つ選択性の生物学的反応を利用して、種々の分野で利用されている。その代表例として、酵素を水不溶性の担体に固定化させてなる固定化酵素や、免疫活性物質を固定化させてなる免疫学的診断試薬が知られている。

このように、酵素や抗体等の生理活性物質を共有結合によって固定化するための担体粒子として、従来、その表面にカルボキシル基、アミノ基、水酸基等の官能基を導入した粒子が知られている。このような担体粒子に生理活性物質を固定化する方法として、例えば、担体粒子表面または生理活性物質中のカルボキシル基をカルボジイミドにて活性化した後、これを対応する生理活性物質また

は担体粒子表面のアミノ基と反応させて、ペプチド結合を形成させる方法や、あるいは担体粒子表面の水酸基を臭化シアンにてイミドカルボナール誘導体に変換した後、これを生理活性物質の有するアミノ基と反応させる方法等が知られている。しかし、かかる方法によれば、該活性物質の有するカルボキシル基やアミノ基は、何らの選択性なしに固定化の反応に與与するので、例えば、酵素に対する活性部位や抗体の抗原結合部位の基質に対する活性部位や抗体の抗原結合部位の高次構造が破壊されることがあり、その結果、固定化された生理活性物質の活性が低下する。

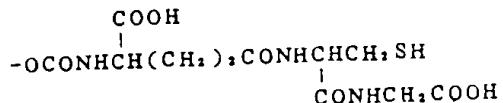
また、酵素や抗体を固定化するための別の一つの方法として、従来、ジスルフィド結合交換反応を用いる方法が知られている。この方法によるとときは、生理活性物質は、それが有するジスルフィド結合またはチオール基の反応によってのみ担体に固定化されるので、上記したような酵素や抗原における高次構造が破壊されることがない。

従来、このようなジスルフィド結合またはこのジスルフィド結合が還元された形態であるチオー

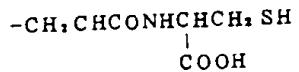
ある。かかる分散安定性が要求される用途として、例えば、粒子に抗体等を固定化した後、血清、尿等の検体と混合して、抗原抗体反応を起こさせ、その凝集の程度から診断を行なう診断用検査薬や、粒子に酵素を固定化した後、水性媒体中に分散させて、基質と反応させる酵素反応等を挙げることができる。

一方、2種以上の単量体成分を選択して乳化共重合を行なう等の方法によって、分散安定性にすぐれる重合体粒子を含むラテックスが得られることは既に知られている。しかし、適当な単量体が見当たらないところから、表面にジスルフィド結合やチオール基を有する重合体粒子は、直接、乳化重合等の方法によって製造することは困難である。また、乳化重合等によって得られた重合体粒子に後反応を施すことによって、重合体粒子にジスルフィド結合やチオール基を導入することができます。一般には、このようにして得られる重合体粒子は、その分散安定性が著しく損なわれて、長期保存安定性に劣ることが多い。さらに、仮に

ル基を粒子表面に有する粒子担体として、例えば、アガロース誘導体に次の基



を結合した活性化チオールセフアロース4B(フアーマシア・ファイン・ケミカルズ社製)や、アクリルアミドゲルに次の基



を結合したエンザクリル(Enzacryl)・ポリチオール(コッホーライト・ラボラトリーズ社製)、ガラスピーズにチオール基を含む置換基を結合したもの等が知られている。しかしながら、上記したような担体粒子は、主として、アフィニティ・クロマトグラフィー用の充填剤として用いられるものであるので、元来、粒子は水性媒体中で分散安定性をもたない。

従って、上記のような従来の担体粒子は、分散安定性が要求される用途には用いることが困難で

ジスルフィド結合またはチオール基を導入した後の重合体粒子がすぐれた分散安定性を有していても、一般には、酵素や抗体等を固定化した後は、その分散安定性が損なわれる場合が多い。他方、一般に、チオール基を表面にもつ重合体粒子は、水性媒体中で保存される間にチオール基が酸化される結果、保存期間が長期間にわたる場合は、チオール基数が減少し、あるいは遅延には消滅するので、チオール基導入による所期の効果が得られなくなる。

<発明が解決しようとする問題点>

本発明は、従来のジスルフィド結合またはチオール基を粒子表面に有する担体における上記問題点を解決するためになされたものであって、粒子表面にジスルフィド結合を有し、且つ水性媒体中で長期間保存しても活性基の減少や消滅がなく、分散安定性にも優れる生理活性物質固定用担体を提供することを目的とする。

<問題点を解決するための手段>

即ち、本発明の生理活性物質固定用担体は、表

面にエポキシ基を有する平均粒径 $0.03 \sim 3\mu$ の
重合体粒子を含むラテックスに、分子末端にアミ
ノ基またはカルボキシル基を有する鎖状ジスルフ
イド化合物が、上記エポキシ基と結合されている
ことを特徴とするものである。

本発明において、表面にエポキシ基を有する重
合体粒子は後述する鎖状ジスルフィド化合物を、
その表面に有するエポキシ基を利用して結合でき
るものであり、 $0.03 \sim 3\mu$ 。好ましくは $0.04 \sim$
 1.5μ の平均粒径を有するものである。粒径が小
さすぎると、該重合体粒子に生理活性物質を固定
して水性媒体中で反応を行なわせた場合、反応後
の回収が困難となる。一方、粒径が大きすぎると、
該重合体粒子の単位体積当たりの粒子表面積が小
くなるので生理活性物質の固定化量が少なくなる
と共に、水性媒体中への分散が困難となるので好
ましくない。

上記重合体粒子はラテックス状態にて得られる
ものであり、通常乳化重合法を利用して調製され
る。つまり、本発明において用いる重合体粒子は

好ましい単量体組成となるのである。これは多官
能性内部架橋用単量体と(メタ)アクリロニトリ
ルとがグリシジル(メタ)アクリレートと有効に
共重合し、内部凝集力を高めながら水不溶性の重
合体粒子を作るためであると推定される。

上記共重合組成において、グリシジル(メタ)
アクリレートは単量体混合物中 $10 \sim 60$ 質量%
の範囲とすることが好ましく、 10 質量%に満た
ないと、得られる重合体粒子の表面に導入される
エポキシ基の量が少なくなり、後述するジスルフ
イド化合物の結合量および生理活性物質の固定化
量が少くなるので好ましくない。また、 60 質
量%を超える量を乳化共重合すると、重合安定性
が悪くなり、重合反応中に多量の凝集物の生成を
伴なうようになる。

多官能性内部架橋用単量体としては、共重合性
が良く、さらに、重合安定性が良好であるものと
して多価アルコールのポリ(メタ)アクリレート
(以下、ポリ(メタ)アクリレートという)を用
いることが好ましく、具体的には、エチレングリ

オールジメタクリレート、ジエチレングリコール
ジメタクリレート、トリエチレングリコールジメ
タクリレート、ジプロピレングリコールジメタク
リレート、 $1, 3$ -ブチレングリコールジメタク
リレート、トリエチレングリコールジアクリレー
ト、トリメチロールプロパントリメタクリレート、
トリメチロールプロパントリアクリレート、テト
ラメチロールメタンテトラアクリレート等が好ま
しく用いられる。また、シビニルベンゼンやN,
 N' -メチレンビスアクリルアミド等も多官能性内
部架橋用単量体として用いることができる。該内
部架橋用単量体は、単量体混合物中、 $1 \sim 30$ 質
量%、好ましくは $2 \sim 20$ 質量%の範囲で用いら
れる。該内部架橋用単量体の量が少なすぎると、
乳化共重合しても添加効果が発現せず、また過多
に使用すると、重合安定性を損ない凝集物量が増
加したり、得られる重合体粒子の水性媒体中の
分散安定性が損なわれるので好ましくない。

上記多官能性内部架橋用単量体と共に乳化共重
合する(メタ)アクリロニトリルは、単量体混合

物中、1～60重量%の範囲で用いることが好ましく、該範囲外では重合安定性や分散安定性が損なわれる場合がある。

本発明に用いる重合体粒子を形成するにおいて、上記各単量体を乳化共重合することによって分散安定性等にすぐれた重合体粒子を得ることができると、得られる重合体粒子のガラス転移点をその用途に応じた所望のものとするために、上記各単量体を除くラジカル重合性単量体を単量体混合物中、10～88重量%、好ましくは20～78重量%の範囲で共重合させてもよい。このような単量体としては、酢酸ビニル、(メタ)アクリル酸アルキルエステル、ステレン、メチルステレン、ビニルトルエン、(メタ)アクリルアミドなどの比較的ガラス転移温度が高い単量体、特に室温以上のガラス転移温度を有する単量体を一種以上用いることが重合体粒子間の触着を防止するために好ましい。これらのうち、特に好適には、メタクリル酸の炭素数1～3のアルキルエステルやステレンが用いられる。

ましく、特に上記単量体組成とすると乳化剤不存在下でも、重合安定性は良好である。しかし、固定される生理活性物質の種類によってはその用途において乳化剤が悪影響を及ぼさない場合もあり、その場合は添加してもよいことはいうまでもない。

上記のような乳化共重合において、単量体成分混合物の水性媒体中の濃度は、得られる分散液における重合体粒子の平均粒径とも関連するが、通常、1～40重量%の範囲である。

重合開始剤としては、水溶性ラジカル重合開始剤が用いられる。通常、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウム、過硫酸アンモニウム等の過硫酸塩や、これら過硫酸塩とチオ硫酸ナトリウム、チオ硫酸カリウム、チオ硫酸水素ナトリウム等のようなチオ硫酸塩、又は亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、亜硫酸水素ナトリウム等のような亜硫酸塩とのレドックス系重合開始剤が好ましく用いられるが、これらに限定されるものではない。これら重合開始剤の使用量は、単量体混合物に対して0.01～1重量%の範囲が好適である。重合の雰囲気も、

上述したように乳化共重合によって表面にエポキシ基を有する平均粒径0.03～3μmの重合体粒子を得る場合、該乳化共重合反応は、PHを7付近に保つて行なうことが望ましい。何故なら、反応時のPHが酸性またはアルカリ性に偏っていると、エポキシ基(グリシル基)が開裂すると共に、水溶性重合体が生じる傾向があり、また、エポキシ基の開裂によって得られる重合体粒子の表面に多くのエポキシ基を有さないようになり、シスルフィド化合物の結合量が充分でなくなるからである。

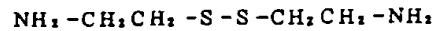
上記のような単量体組成は、水性媒体中にて従来より知られている通信の方法にて乳化共重合させることができるが、本発明の生理活性物質固定用担体は、乳化剤が吸着などによって混在すると、例えば抗原抗体反応を凝集化現象によつて判断する特異的な反応に用いた場合に、液体中に目的とする抗原または抗体がなくとも凝集してしまう、所謂非特異的凝集を生じることがある。従つて、乳化共重合に際しては乳化剤を用いないことが好

ましく、特に上記単量体組成とすると乳化剤不存在下でも、重合安定性は良好である。しかし、固定される生理活性物質の種類によってはその用途において乳化剤が悪影響を及ぼさない場合もあり、その場合は添加してもよいことはいうまでもない。

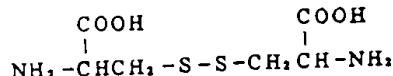
上記のようにして得られる重合体粒子は、前述したように平均粒径が0.03～3μmを有するものであり、水性媒体中の分散安定性にすぐれたものであるが、該重合体粒子の比重も0.9～1.5の範囲に調整することが水性媒体中の分散安定性の維持や、シスルフィド化合物との結合反応、生理活性物質の固定化反応を行ないやすく好ましいものである。

本発明の生理活性物質固定用担体は上記重合体粒子の表面に存在するエポキシ基に、分子末端にアミノ基またはカルボキシル基を有する鎖状シスルフィド化合物を結合することによつて得られる。

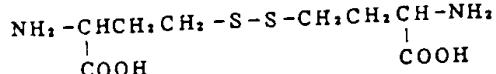
このような鎖状シスルフィド化合物としては、例えば、式



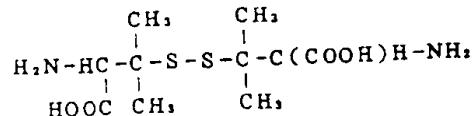
で表わされるシスタミン、式



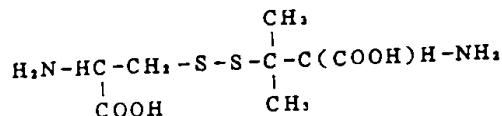
で表わされるシスチン、式



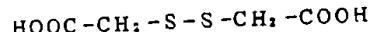
で表わされるホモシスチン、式



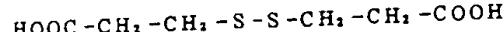
で表わされるベニシラミンジスルフィド、式



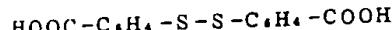
で表わされるベニシラミンシステインジスルフィド、式



で表わされるジチオジグリコール酸、式



で表わされるジチオジプロピオン酸、式



製する。

このようにして得られる本発明の生理活性物質固定用担体は、重合体粒子表面に鎖状ジスルフィド結合を有するものであり、分子内にジスルフィド結合またはチオール基を有する生理活性物質とジスルフィド結合交換反応によって固定化できるものである。また、本発明の担体はそのままで生じるものである。また、本発明の担体はそのままで生理活性物質と反応させて固定化できるが、該担体の表面に有するジスルフィド結合を、適宜の還元剤にて還元してチオール基とし、チオール基を有する担体として生理活性物質の固定に供することもできる。ジスルフィド結合を還元するには、特に限定されるものではないが、例えば、本発明の担体を含むラテックス中に2-メルカプトエチルアミン、2-メルカプトエタノール、ジチオスライトール、水素化ホウ素ナトリウム等のような還元剤を加え、混合して、放置した後、遠心分離し、上澄み液を捨て、生成した沈殿に水性媒体を加えて、これを再分散させ、この後、遠心分離と再分散とを繰り返せばよい。

で表わされるジチオサリチル酸

などを挙げることができる。

上記鎖状ジスルフィド化合物をエポキシ基と反応させるには、エポキシ基を表面に有する重合体粒子を含むラテックス中に、該ジスルフィド化合物を添加、混合し、単に攪拌を行なうだけによく、この際の反応温度は通常20～90℃、好ましくは30～70℃にて行なわれ、数時間～数日間で反応が完了する。

本発明の生理活性物質固定用担体は上記のように、表面にエポキシ基を有する重合体粒子のエポキシ基と、特定の官能基を有する鎖状ジスルフィド化合物とを反応させて、粒子表面にジスルフィド結合を導入したものである。この表面に導入するジスルフィド結合の量は固定すべき生理活性物質の量によって任意に選択することができるが、固定化量の調査のしやすさや、水性媒体中での分散安定性を考慮すると、担体の表面にジスルフィド結合が $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol/m}^2$ 、好ましくは $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol/m}^2$ の範囲となるよう調整する。

<発明の効果>

以上のように、本発明の生理活性物質固定用担体によれば、ジスルフィド結合またはチオール基を有する酵素や各種タンパクなどの生理活性物質をジスルフィド結合交換反応によって比較的容易に共有結合にて固定化することができると共に、得られる固定化担体も水性媒体中で分散安定性にすぐれるものである。

また、鎖状ジスルフィド化合物との結合用のエポキシ基を、特定単体量を乳化共重合して導入した場合には、生理活性物質固定用担体の粒子表面にエポキシ基を高密度、且つ均一に導入できるので、生理活性物質の固定化量を多くすることも可能である。

<実施例>

以下に本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、何らこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲で種々の応用が可能である。

実施例1

(a) 複合体粒子の調製

グリシジルメタクリレート 18 g、メチルメタクリレート 26 g、トリエチレングリコールジメタクリレート 4 g およびアクリロニトリル 12 g を蒸留水 340 g に加え、過酸化カリウム 0.3 g を水 10 g に溶解した複合開始剤水溶液を窒素気流下にて加えて 70 ℃ の温度で乳化複合を開始した。系の pH' を 7.0 に維持しながら 6 時間攪拌して複合を行ない、固体分濃度約 15 重量%、平均粒径 0.45 μm の表面にエポキシ基を有する複合体粒子を含むラテックスを得た。複合反応は非常に安定をして行なわれ、収集物量は約 0.05 重量% であった。

得られたラテックスを遠心分離し、沈降した複合体粒子を蒸留水にて洗浄するという操作を 3 回繰り返した後、固体分濃度が 15 重量% となるように蒸留水中に再分散させた。

(b) シスルフィド化合物の結合

上記にて得た複合体粒子を含むラテックス 40 mL に 10 重量% のシスタミン水溶液 40 mL を加え、40 ℃ で 24 時間、攪拌しながら反応させた。次

時間シスルフィド結合交換反応させた。次いで遠心分離により 3 回洗浄したのち、0.01 mol/L ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) にて再分散させて、β-D-ガラクトシダーゼ固定化担体を得た。β-D-ガラクトシダーゼの固定化量は担体粒子 1 g 当り 36 mg であり、活性收率は 64 % であった。尚、活性收率は酵素活性の理論量に対する実験的活性割合として定義され、本発明においてはラクトースを基質として、NAD およびガラクトースデヒドロゲナーゼの共存下にて反応させ、生成した NADH を 340 nm における吸光度から測定して実験的酵素活性とし、これと等しい活性を有する遊離の酵素量を酵素固定量で除して求めた。

一方、上記(b)にて得られた生理活性物質固定用担体を含むラテックスを、25 ℃ にて保存したのち、上記と同様にして β-D-ガラクトシダーゼを固定した。固定された酵素量および保存 0 か月目の単位重量ポリマー粒子当たりの酵素活性を 100 % とした相対活性を第 1 表に示した。

IC、水相中に存在する未反応のシスタミンを除去するために、遠心分離し、蒸留水にて 5 回洗浄したのち、0.01 mol/L ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) にて再分散させた。

得られた複合体粒子の表面に結合したシスルフィド結合の量は、水素化ホウ素ナトリウムにて開裂させ、完全にチオール基に還元したのち、4'-イソチオシアニンにて定量したところ、 $6.7 \times 10^{-6} \text{ mol/m}^2$ であった。

(c) 担体への酵素の固定化

得られた本発明の生理活性物質固定用担体を含むラテックス (固体分濃度 15 重量%) 5 mL、2-メルカプトエチルアミン水溶液 (1 mol/L) 20 mL を加え、攪拌しながら 25 ℃ にて 3 時間反応させた。次に、0.01 mol/L ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) にて 5 回遠心分離による洗浄を行ない、上記と同じ緩衝液にて固体分濃度が 5 重量% となるように再分散させた。

この分散液 4 mL に β-D-ガラクトシダーゼ (4 mg/mL) 4 mL を加え、攪拌しながら 5 ℃ にて 12

第 1 表

保存期間	固定化量 (mg/g)	相対活性 (%)
0 か月	36	100
1 か月	31	109
2 か月	34	106
4 か月	34	105

第 1 表から明らかのように、本発明の生理活性物質固定用担体は 4 ヶ月保存後においても粒子表面に存在するシスルフィド結合が酵素の固定化のために有効に機能するものである。

比較例 1

実施例 1 の(b)において結合させたシスルフィド化合物としてのシスタミンの代わりに、チオール化合物としての 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩を同量用いた以外は全て実施例 1 と同一条件にて反応を行ない、β-D-ガラクトシダーゼ固定化担体を得た。固定化前の固定用担体粒子表面に存在するチオール基の量は $3.9 \times 10^{-6} \text{ mol/m}^2$ であ

った。

β -D-ガラクトシダーゼ固定化担体の固定化量および保存0か月目の単位重量ポリマー粒子当たりの酵素活性を100%とした相対活性を実施例1と同様に保存前、保存後に測定し、その結果を第2表に示した。

第2表

保存期間	固定化量 (mg/g)	相対活性 (%)
0か月	21	100
1か月	12	68
2か月	4	24
4か月	4	21

第2表から明らかのように、ジスルフィド化合物の代わりに、チオール化合物を結合した生理活性物質固定用担体では、保存中にチオール基が酸化されて固定化に必要なチオール基が減少するので、保存時間の経過と共に固定化量が減少し、単位重量ポリマー粒子当たりの酵素活性も低下すること

うに蒸留水中に再分散させた。

(b) ジスルフィド化合物の結合

上記にて得た混合体粒子を含むラテックス40mlに10重量%のジテオジグリコール酸水溶液40mlを加え、40℃で48時間、攪拌しながら反応させた。次に、水相中に存在する未反応のシタミンを除去するために、遠心分離し、蒸留水にて5回洗浄したのち、0.01mol/lホウ酸緩衝液(pH 7.0)に再分散させた。

得られた混合体粒子の表面に存在するジスルフィド結合の量は、 1.9×10^{-6} mol/m²であった。

(c) 搾体への酵素の固定化

得られた本発明の生理活性物質固定用担体を含むラテックスに、実施例1と同様にして β -D-ガラクトシダーゼを固定したところ、固定化量は担体粒子1g当たり27mgであり、活性収率は68%であった。

一方、上記(b)にて得られた生理活性物質固定用担体を含むラテックスを、25℃にて保存したのち、上記と同様にして β -D-ガラクトシダーゼ

とが判明した。

即ち、本発明の生理活性物質固定用担体に存在するジスルフィド結合はそのまま、もしくはチオール基に還元して固定化反応に使用できるが、固定化するまではジスルフィド結合のままで保存しておく必要があることを示すものである。

実施例2

(a) 混合体粒子の調製

グリシジルメタクリレート18g、ステレン15g、メチルメタクリレート13g、ジビニルベンゼン2gおよびアクリロニトリル12gを蒸留水340gに加え、実施例1と同様の条件下にて乳化共重合を行ない、固形分濃度約15重量%、平均粒径0.47μmの表面にエポキシ基を有する混合体粒子を含むラテックスを得た。重合反応は非常に安定して行なわれ、収率物量に約0.05重量%であった。

得られたラテックスを遠心分離し、沈降した混合体粒子を蒸留水にて洗浄するという操作を3回繰り返した後、固形分濃度が15重量%となるよ

うに蒸留水中に再分散させた。

得られた混合体粒子を含むラテックス40mlに10重量%のジテオジグリコール酸水溶液40mlを加え、40℃で48時間、攪拌しながら反応させた。次に、水相中に存在する未反応のシタミンを除去するために、遠心分離し、蒸留水にて5回洗浄したのち、0.01mol/lホウ酸緩衝液(pH 7.0)に再分散させた。

第3表

保存期間	固定化量 (mg/g)	相対活性 (%)
0か月	27	100
1か月	30	91
2か月	27	103
4か月	26	90

特許出願人

日東電気工業株式会社

代表者 雄居五朗